

AL

Original document

AMYLASE PRODUCING MALTOHEXAOSE AND MALTOHEPTAOSE AND PRODUCTION THEREOF

Patent number: JP7236478
Publication date: 1995-09-12
Inventor: NAKANO MASAYUKI; CHAEN HIROTO;
SUGIMOTO TOSHIYUKI; MIYAKE TOSHIO
Applicant: HAYASHIBARA BIOCHEM LAB

Classification:







- international: *A23G3/00; A23G3/34; A23L1/09; A23L1/187;
A23L1/218; A23L1/236; A61K8/60; A61K8/73;
A61Q11/00; A61Q17/04; A61Q19/00; A61Q19/02;
C12N9/26; C12P19/14; C13K13/00; A23G3/00;
A23G3/34; A23L1/09; A23L1/187; A23L1/218;
A23L1/236; A61K8/30; A61K8/72; A61Q11/00;
A61Q17/04; A61Q19/00; A61Q19/02; C12N9/26;
C12P19/00; C13K13/00; (IPC1-7): C12N9/26;
A23L1/236; A61K7/00; C08B37/00; C12P19/20*

- european:

Application number: JP19940054371 19940301

Priority number(s): JP19940054371 19940301

Also published as:

 EP0670368 (A2)
 US5527699 (A1)
 EP0670368 (A3)
 EP0670368 (B1)
 DE69533118T (T2)
 DE69533118D (T2)

less <<

[View INPADOC patent family](#)[Report a data error](#)

Abstract of JP7236478

PURPOSE: To provide a novel amylase which forms a product mixture containing high content of maltohexaose and maltoheptaose from starch and is useful as a composition for food, beverage, cosmetics, medicines or molded products. **CONSTITUTION:** A mylase which is obtained by culturing *Alcaligenes latus* D2271 and has the following properties: (1) it acts on starch to form maltohexaose and maltoheptaose, but substantially causes no decomposition of oligosaccharides lower than hexaose and heptaose, too; (2) the optimal pH is about 5.0 in the presence of calcium ion; (3) the optimal temperature is about 70 deg.C in the presence of calcium ion; (4) the pH stable zone is from about 4.5 to 10.5 in the presence of calcium ion; (5) it is stable up to about 60 deg.C in the presence of calcium ion; (6) the molecular weight is 43,000+ or -3,000 dalton (SDS-gel electrophoresis) and (7) the isoelectric point is 7.6+ or -0.5 (according to the ampholyte- containing electrophoresis).

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

Description of corresponding document: EP0670368

AL

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 7 - 2 3 6 4 7 8

(43) 公開日 平成 7 年 (1995) 9 月 12 日

(51) Int. Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 9/26	A			
A23L 1/236	A			
A61K 7/00	F			
C08B 37/00	P	7433-4C		
C12P 19/20		7432-4B		
審査請求 未請求 請求項の数 19 F D (全 15 頁)				

(21) 出願番号 特願平 6 - 5 4 3 7 1
 (22) 出願日 平成 6 年 (1994) 3 月 1 日

(71) 出願人 000155908
 株式会社林原生物化学研究所
 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号
 (72) 発明者 中野 真之
 岡山県都窪郡早島町前潟 595 番地の 1
 (72) 発明者 茶園 博人
 岡山県岡山市湊 107 番地の 2
 (72) 発明者 杉本 利行
 岡山県岡山市東畦 695 番 44 号
 (72) 発明者 三宅 俊雄
 岡山県岡山市伊島町 1 丁目 3 番 23 号

(54) 【発明の名称】 マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとその製造方法並びに用途

(57) 【要約】

【目的】 澱粉から多量のマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する新規アミラーゼとその製造方法並びに用途を提供する。

【構成】 本発明は、澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないことを特徴とする微生物由来のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ、それを産生する微生物、この微生物からの該アミラーゼの製造、澱粉質に該アミラーゼを作用させて得られる糖質並びにこの糖質を含有せしめた組成物を主な構成とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ。

【請求項2】 マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼが微生物由来の酵素であることを特徴とする請求項1記載のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ。

【請求項3】 下記の理化学的性質を有するマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ。

(1) 作用

澱粉に作用して、主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する。マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖を実質的に分解せず、マルトヘプタオースにも作用しにくい。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法で、 $43,000 \pm 3,000$ ダルトン

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法で、 7.6 ± 0.5

(4) 至適pH

約5.0 (カルシウムイオン存在下)

(5) 至適温度

70℃付近 (カルシウムイオン存在下)

(6) pH安定性

約4.5乃至10.5 (カルシウムイオン存在下)

(7) 温度安定性

60℃付近まで安定 (カルシウムイオン存在下)

【請求項4】 澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ産生能を有する微生物を栄養培地に培養し、培養物から該マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを採取することを特徴とするマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの製造方法。

【請求項5】 マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ産生能を有する微生物がアルカリゲネス属に属する微生物であることを特徴とする請求項4記載のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの製造方法。

【請求項6】 澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ産生能を有する微生物アルカリゲネスラタス (*Alcaligenes latus*) D2

271 (工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号 FERM BP-4578)。

【請求項7】 澱粉質に対し、澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを作用させるか、又は該マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させ得られるマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質を採取することを特徴とするマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質の製造方法。

【請求項8】 マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼが、微生物由来のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼであることを特徴とする請求項7記載のマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質の製造方法。

【請求項9】 澱粉質に対し、澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを作用させるか、又は該マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させ、次いで夾雑糖質を分離して得られるマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース高含有糖質を採取することを特徴とする請求項7又は8記載のマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質の製造方法。

【請求項10】 夾雑糖質を分離する方法が、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーであることを特徴とする請求項9記載のマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質の製造方法。

【請求項11】 澱粉質に対し、澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを作用させるか、又は該マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させ得られるマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質を水素添加してマルトヘキサイトール及び/又はマルトヘプタイトール含有糖質とし、これを採取することを特徴とするマルトヘキサイトール及び/又はマルトヘプタイトール含有糖質の製造方法。

【請求項12】 マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼが、微生物由来のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼであることを特徴とする請求項11記載のマルトヘキサイトール及び/又はマルトヘプタイトール含有糖質の製造方法。

【請求項13】 澱粉質に対し、澱粉から主としてマル

トヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを作用させるか、又は該マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させ得られるマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質を水素添加してマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質とし、次いで夾雑糖質を分離して得られるマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール高含有糖質を採取することを特徴とする請求項11又は12記載のマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質の製造方法。

【請求項14】 夾雑糖質を分離する方法が、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーであることを特徴とする請求項13記載のマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質の製造方法。

【請求項15】 澱粉質に対し、澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する作用を有し、かつ、マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖には実質的に分解作用を有さないマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを作用させるか、又は該マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させ得られるマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質、又はこれを水素添加して得られるマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質を含有せしめた組成物。

【請求項16】 マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼが、微生物由来のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼであることを特徴とする請求項15記載のマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質、又はこれを水素添加して得られるマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質を含有せしめた組成物。

【請求項17】 マルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース、又は、マルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトールが、夾雑糖質を分離して得られたマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース、又は、マルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール高含有糖質であることを特徴とする請求項15又は16記載のマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質、又はこれを水素添加して得られるマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質を含有せしめた組成物。

【請求項18】 マルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質、又は、マルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質をマルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトヘキサイトール又

はマルトヘプタイトールとして0.1w/w%以上含有せしめた請求項15、16又は17記載のマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質、又はこれを水素添加して得られるマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質を含有せしめた組成物。

【請求項19】 組成物が、飲食物、化粧品、医薬品又は成形物であることを特徴とする請求項15、16、17又は18記載のマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質、又はこれを水素添加して得られるマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質を含有せしめた組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、澱粉から主にマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成するマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとその製造方法、それを産生する微生物、並びに、このマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを用いて製造されるマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質、又は、これを水素添加して得られるマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質、更には、これらを含有せしめた組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 澱粉に特定のアミラーゼを作用させることによって、マルトース、マルトテトラオースなどの特定のマルトオリゴ糖を特異的に生成せしめる方法は、工業的規模で実施されており、食品、医薬品などの組成物に広く利用されている。

【0003】 近年、マルトオリゴ糖の中でも比較的分子量の高い糖質が低甘味で消化吸収され易いという理由から、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどのマルトオリゴ糖を多量に含む糖質が望まれている。

【0004】 澱粉からマルトヘキサオースを多く生成するアミラーゼとしては、微生物起源の酵素がいくつか知られているが、マルトヘプタオース以上のマルトオリゴ糖を特異的に生成するアミラーゼは知られていない。

【0005】 澱粉から主にマルトヘキサオースを生成するアミラーゼは、その作用性から大きくふたつに分類され、ひとつは、澱粉糖鎖の非還元性末端から順次マルトヘキサオースを切り出していくエキソ型のマルトヘキサオース生成アミラーゼ、すなわちマルトヘキサオヒドロラーゼ(EC3.2.1.98)、もうひとつは、澱粉糖鎖の内部にも作用して、マルトヘキサオースを比較的多く生成するエンド型マルトヘキサオース生成アミラーゼ、いわゆるエンド型 α -アミラーゼ(EC3.2.1.1)である。

【0006】エキソ型マルトヘキサオースアミラーゼについては、貝沼等が、『フェブス・レターズ (FEBS Letters)』、第26巻、第281乃至285頁(1972年)に、アエロバクター アエロゲネス (*Aerobacter aerogenes*) が菌体内に産生することを報告しているが、この酵素は至適温度、安定温度が低く、工業的に利用する上で耐熱性が不十分である。

【0007】エンド型マルトヘキサオース生成アミラーゼについては、ゼイ・エフ・ケネディ (J. F. Kennedy) 等が、『スターチ (Starch)』、第31巻、第235乃至241頁(1979年)に、バチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*) が産生することを報告し、また、高崎が、『アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)』、第46巻、第1539乃至1547頁(1982年)に、バチラス サーキュランス (*Bacillus circulans*) G-6が産生することを報告し、また、谷口等が、『澱粉科学』、第29巻、第107乃至116頁(1982年)に、バチラス サーキュランス F-2が産生することを報告し、更に、林等が、『アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー』、第52巻、第443乃至448頁(1988年)に、バチラス・スピーシーズ H-167が産生することを報告している。これらのうち、バチラス サーキュランス G-6、バチラス サーキュランス F-2、及びバチラス・スピーシーズ H-167由来のアミラーゼは、澱粉からマルトヘキサオースを最大約25乃至30w/w% (以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w%を%と略称する。) 生成するが、マルトヘプタオースを全く生成せず、しかも、反応が進むにつれ、生成したマルトヘキサオースをマルトース及びマルトテトラオースに分解することが知られている。

【0008】一方、バチラス サブチリス由来のアミラーゼは、生成したマルトヘキサオースの分解を示さないものの、澱粉からのマルトヘキサオースの生成率は最大でも約25%止まりである。更には、これら微生物由来の酵素は、実際、澱粉の糖化条件においてマルトヘキサオース含量はあまり高くなり低分子オリゴ糖が多くなることに加えて、微生物からの産生量が低いことなどの理由から、現実には、これら微生物の産生するアミラーゼを用いたマルトヘキサオース高含有糖質の工業的製造は行われていない。

【0009】一方、麦芽から調製された精製 α -アミラーゼは、澱粉への作用において、反応初期には主にマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成することが、『アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー』、第42巻、第259乃至267頁(1978年)に記載されている。しかしながら、その反応が進むにつれ、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースはさらにマルトース、マルトテトラオースなどの低分子オリゴ糖にほぼ完全に分解されることも同時に記載されており、したがって、澱粉から主としてマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを含有する糖化物を製造することはできなかった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、澱粉からマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを高含量に生成し、生成したマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースをほとんど分解しないアミラーゼと該アミラーゼを利用したマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質の製造方法並びにその用途を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記課題を解決するために澱粉からマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを生成する新規なアミラーゼを求めて、その酵素を産生する微生物を広く検索した。その結果、山梨県駒ヶ岳付近の土壌から分離したアルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属に属する新規微生物アルカリゲネス ラタス (*Alcaligenes latus*) D2271が澱粉からマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを高含量に生成する新規アミラーゼ (本明細書では、本アミラーゼを「マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ」と略称することがある。) を産生することを見だし、本酵素を澱粉質に作用させ得られるマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質の製造方法を確立し、併せて、これら糖質を含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品、成形物などの組成物を確立して本発明を完成した。

【0012】以下、本発明の新規微生物アルカリゲネス ラタス D2271の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』(長谷川武治編、学会出版センター、1985年)に準拠して行った。

【0013】

【A 細胞形態】

(1) ポテト・デキストロース寒天培養、27℃: 0.7乃至1.3×1.3乃至2.4 μ mの桿菌。単独、希に対をなし、連鎖した細胞も観察される。周鞭毛による運動性あり。無孢子。非抗酸性。グラム陰性。ポリ- β -ヒドロキシブチレートを蓄積する。

(2) 酵母エキス・麦芽エキス寒天培養、37℃: 培養1日の細胞の大きさは、0.5乃至1.0×1.3乃至2.4 μ m、培養3日で0.5乃至1.0×1.0乃至2.5 μ m。単独。

【0014】

【B 培養的性質】

(1) ポテト・デキストロース寒天平板培養、37℃

7
 形状 : 円形 大きさは1日で約1 m
 m。4日で3乃至4 mm。
 周縁 : 全縁
 隆起 : 臍状
 光沢 : 鈍光
 表面 : しわ状
 色調 : 不透明、白～黄土色
 (2) 酵母エキス・麦芽エキス寒天平板培養、37℃
 形状 : 円形 大きさは4日で約3乃
 至5 mm
 周縁 : 全縁
 隆起 : 半レンズ状
 光沢 : 湿光
 表面 : 平滑
 色調 : 白～クリーム色
 (3) ポテト・デキストロース寒天斜面培養、37℃
 生育度 : 良好
 形状 : 糸状
 (4) 酵母エキス・麦芽エキスゼラチン穿刺培養、37
 ℃: 液化

10

20

(16) 炭素源の利用と酸生成の有無

	利用性	酸生成能
D-グルコース	利用する	陰性
D-ガラクトース	利用する	陰性
D-マンノース	利用する	陰性
D-フラクトース	利用する	陰性
L-アラビノース	利用する	陰性
D-キシロース	利用する	陰性
L-ラムノース	利用する	陰性
マルトース	利用する	陰性
スクロース	利用する	陰性
ラクトース	利用する	陰性
トレハロース	利用する	陰性
ラフィノース	利用する	陰性
マンニトール	利用しない	陰性
デキストリン	利用する	陰性
ズルチトール	利用しない	陰性

(17) アミノ酸の脱炭酸試験 : L-リジン、L-ア
 ルギニン、オルニチン、いずれに対しても陰性。

(18) DNase : 陰性

(19) 3-ケトラクトースの生成 : 陰性

(20) DNAのG-C含量 : 67%

【0016】以上の菌学的性質に基づいて、『バージー
 ズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオ
 ロジー 第1巻 (Bergey's Manual o
 f Systematic Bacteriology
 Volume 1)』、(1984年)を参考にして公
 知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、アルカリ
 ゲネス ラタスに属する菌株であることが判明した

【0017】これらの結果から、本発明者等は、本微生物 50

【0015】

【C 生理学的性質】

- (1) 硝酸塩の還元性 : 陽性 (コハク酸培地)
 (2) 脱窒反応 : 陰性
 (3) メチルレッド試験 : 陰性
 (4) VP試験 : 陰性
 (5) インドールの生成 : 陰性
 (6) 硫化水素の生成 : 陰性
 (7) 澱粉の加水分解 : 陽性
 (8) クエン酸の利用 : 陰性
 (9) 無機窒素源の利用 : アンモニウム塩及び硝
 酸塩ともに利用できる。
 (10) 色素の生成 : 陰性
 (11) ウレアーゼ : 陽性
 (12) オキシダーゼ : 陽性
 (13) カタラーゼ : 陽性
 (14) 生育の範囲 : pH5乃至8、温度
 10乃至41℃。
 (15) 酸素に対する態度 : 好気性

40

50

物をアルカリゲネス ラタス (*Alcaligenes
 latus*) D2271と命名し、平成6年2月23
 日付けで、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商
 産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物
 寄託センターに寄託し、『受託番号、FERM BP-
 4578』として受託された。

【0018】本発明では、上記菌のみならずアルカリゲ
 ネス ラタスに属し、マルトヘキサオース・マルトヘブ
 タオース生成アミラーゼ産生能を有する他の菌株やこれ
 らの変異株なども使用することができる。

【0019】本発明の微生物の培養に用いる培地は、本
 微生物が生育でき、本発明の酵素を産生するものであれ
 ばよく、合成培地及び天然培地のいずれでもよい。炭素

源としては、本菌株が資化できる物であればよく、例えば、マルトース、デキストリン、澱粉などの糖類、糖蜜、及び酵母エキスなどの糖含有物などの天然物なども使用することができる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適宜選択される。例えば、培養液の澱粉の濃度は、20重量%以下が望ましく、菌の生育及び増殖からは、通常、5%以下が好ましい。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物及び、例えば、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが必要に応じて適宜用いられる。

【0020】培養は、通常、温度10乃至40℃、好ましくは25乃至37℃、pH5乃至8、好ましくはpH6乃至7.5から選ばれる条件で、好気的に行われる。培養時間は本微生物が増殖し得る時間であればよく、好ましくは10乃至100時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、0.5乃至20ppmが好ましい。そのために、通気量を調節したり、攪拌したり、酸素を使用したり、また、培養槽内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養又は連続培養のいずれでもよい。

【0021】このようにして、微生物を培養した後、得られる培養物から本発明の酵素を採取する。本酵素活性は、培養物の菌体外培養液に認められ、菌体外培養液を粗酵素として採取すればよく、また、培養物全体を粗酵素として用いることもできる。菌体外培養液と菌体との分離には通常の固液分離手段が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する手段、培養物に濾過助剤を加えたり、あるいは、プレコートすることにより濾過分離する手段、平膜、中空糸膜などを用いる膜濾過分離する手段などを適用し得る。菌体外培養液をそのまま粗酵素液として用いることもできるが、好ましくは通常的手段で濃縮する。例えば、硫酸塩析法、アセトン及びアルコール沈殿法、平膜、中空糸膜などを用いる膜濃縮法などが採用される。

【0022】更に、菌体外培養液及びその濃縮物は、通常的手段で固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが採用される。

【0023】粗酵素はそのまま用いてもよいが、通常的手段によって精製することもできる。一例として、菌体外培養液を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、DEAE-トヨパール樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、ブチルトヨパール樹脂を用いた疎水カラムクロマトグラフィー、フェニルスーパーロース HR5/5樹脂を用いた疎水カラムクロマ

トグラフィーにて電気泳動的に単一の酵素を得ることができる。

【0024】このようにして得られる本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼは、下記の理化学的性質を有する。

(1) 作用

澱粉に作用して、主としてマルトヘキサオース、マルトヘプタオースを生成する。マルトヘキサオース以下の低分子オリゴ糖を実質的に分解せず、マルトヘプタオースにも作用しにくい。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法で、 $43,000 \pm 3,000$ ダルトン

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法で、 7.6 ± 0.5

(4) 至適pH

約5.0 (カルシウムイオン存在下)

(5) 至適温度

70℃付近 (カルシウムイオン存在下)

(6) pH安定性

約4.5乃至10.5 (カルシウムイオン存在下)

(7) 温度安定性

60℃付近まで安定 (カルシウムイオン存在下)

(8) 活性促進、安定化

カルシウムイオンによって活性促進及び安定化される。

(9) 阻害

銅イオン、鉛イオン、亜鉛イオン、水銀イオン、又はEDTAで阻害を受ける。

【0025】本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの活性は次のようにして測定する。基質として可溶性澱粉0.3w/v% (20mM酢酸緩衝液、pH5.5、1mM CaCl₂を含む) 5mlに酵素液0.2mlを加え、40℃で10分間反応させた後、反応液0.5mlを0.02N硫酸水溶液15mlに加えて反応を停止させる。この反応停止液に0.1Nヨウ素溶液0.2mlを添加、攪拌し、25℃に15分放置した後、660nmにおける吸光度を測定する。酵素活性1単位は、40℃、10分の反応で可溶性澱粉15mgのヨウ素呈色を完全に消失させる酵素量とする。

【0026】本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを利用してマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質を製造するに際しては、工業的には、澱粉、アミロペクチン、アミロース、澱粉加水分解物などの澱粉質を基質として反応させるのが好ましい。

【0027】また、必要ならば、澱粉質含有飲食物の製造に際して、マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを作用させ、飲食物にマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオースを含有せしめ、澱粉質

の老化を防止し、飲食物の日持ちを延長することもできる。

【0028】一般的には、5乃至45%程度の澱粉質溶液に、望ましくは、これに塩化カルシウムなどのカルシウム塩を濃度0.5乃至50mM程度共存させた溶液に、本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを澱粉質グラム当たり約0.5乃至20単位の割合で加え、pH3乃至8、反応温度40乃至90℃で1乃至100時間反応させる。

【0029】また、反応物中のマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含量をできるだけ高めるためには、澱粉質の酸又は α -アミラーゼによる液化の程度をできるだけ低く、DE10未満、好ましくはDE5未満にとどめたものに、マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを作用させるのが好ましい。

【0030】また、反応に際して、マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとともに、他の澱粉質関連酵素、例えば、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC2.4.1.19)、 α -アミラーゼ(EC3.2.1.1)、 β -アミラーゼ(EC3.2.1.2)、グルコアミラーゼ(EC3.2.1.3)、 α -グルコシダーゼ(EC3.2.1.20)、プルラーゼ(EC3.2.1.41)、イソアミラーゼ(EC3.2.1.68)、マルトテトラオース生成アミラーゼ(EC3.2.1.60)などを併用して、得られるマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質の組成を変えたり、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含量を高めたりすることも随意である。

【0031】とりわけ、澱粉質にマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとプルラーゼ、イソアミラーゼなどの澱粉枝切酵素とを併用してマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース生成率を高めることは有利に実施できる。このようにして得られるマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースの合計含量が固形物当たり30乃至50%程度のマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質を原料として、夾雑する糖類、デキストリンなどを分離し、マルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオースを採取することも有利に実施できる。

【0032】分離法としては、例えば、特開昭48-4647号公報に記載される半透膜の利用、特開昭49-102854号公報に記載される有機沈澱剤の利用、特開昭59-148794号公報に記載される塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーの利用などが適宜選択され、必要ならば、純度90%以上のマルトヘキサオース高含有糖質、又は、マルトヘプタオース高含有糖質を採取することも可能である。とりわけ、塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いる方法により、夾雑糖質を分離除去して、マルトヘキサオース高含有液

及び/又はマルトヘプタオース高含有液を採取する方法は、工業的規模で有利に実施することができる。この際、公知の固定床方式、移動床方式、疑似移動床方式のいずれを採用することも随意である。

【0033】酵素反応液又は夾雑糖質を分離した液は、常法により、濾過、遠心分離などして不溶物を除去した後、活性炭による脱色、H型、OH型イオン交換樹脂による脱塩などの精製工程を経た後、濃縮し、シラップ状製品にする。必要ならば、更に、噴霧乾燥などの方法で乾燥して粉末状製品にすることも随意である。

【0034】このようにして得られる本発明のマルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質は、通常、マルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオースを固形物当たり30%以上、更には40%以上含有しており、この粉末品は、その含量の程度によっても多少変動するものの、実質的に難吸湿性であり、固結せず、流動性良好であるので取扱い容易であり、その包装、輸送、貯蔵などの管理に要する物的、人的経費が大幅に削減できる。

【0035】また、この粉末品は、実質的に難吸湿性粉末で、耐熱性が高く、安定性も良いので、従来きわめて困難とされていた粉末混合甘味料、即席ジュース、即席スープ、顆粒、錠剤などの賦形剤、増量剤、粉末基剤などとして、更には、小麦粉、コーングリッツ、澱粉など粉類の一部又は全量に置き換えて、例えば、プリンミックス、ホットケーキミックス、製菓材料、製パン材料、シリアル材料などに利用することも有利に実施できる。更に、マルトヘキサオース及び/又はマルトヘプタオース含有糖質を還元して、化学的により安定なマルトヘキサイトール及び/又はマルトヘプタイトール含有糖質を製造する事も有利に実施できる。

【0036】例えば、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質を、濃度約40乃至60%水溶液にし、オートクレーブに入れ、触媒としてラネーニッケルを約8乃至10%添加し、攪拌しながら温度を90乃至140℃に上げ、水素圧を20乃至150kg/cm²に上げて水素添加を完了させた後、ラネーニッケルを除去し、次いで、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質製造の場合と同様に、脱色、脱塩して精製し、濃縮してシラップ状製品とするか、更に噴霧乾燥などにより乾燥して粉末状製品とする。

【0037】このようにして得られるマルトヘキサイトール及びマルトヘプタイトール含有糖質には、通常、マルトヘキサイトール及びマルトヘプタイトールを固形物当たり30%以上含有する。このようにして得られるマルトヘキサイトール及びマルトヘプタイトール含有糖質を原料として、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオースの場合と同様に、分画法などにより、夾雑糖質を分離し、更に高純度のマルトヘキサイトール及び/又はマルトヘプタイトールを採取することも有利に実施でき

る。

【0038】以上述べた方法で製造されるマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質又はマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質は、低甘味の甘味剤として、また、ホディー付与剤、粘度調節剤、保湿剤、照付与剤、保香剤、結晶防止剤、キャンディーのダレ防止剤、澱粉老化防止剤などとして、さらには、栄養補給用剤として広く飲食物、嗜好物、飼料、化粧品、医薬品、成形物など、更には、生活用品、農林水産用品、試薬、化学工業用品などの各種組成物に有利に利用される。

【0039】マルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質又はマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質は、低甘味ながら、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができるが、必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メイプルシュガー、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 α -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の一種又は二種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などと混合して使用することもできる。

【0040】また、マルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質又はマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質の呈味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0041】例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、たくあん漬の素、白菜漬の素、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンデーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベット、などの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、

シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきすめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、清酒、合成酒、リキュール、洋酒などの酒類、紅茶、コーヒー、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤などの各種飲食物への甘味付けに、呈味改良に、また、物性改良などに有利に利用できる。

【0042】また、家畜、家禽、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、更には、品質改良剤として有利に利用できる。

【0043】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適応できる。例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター α 、ツモア・ネクロシス・ファクター β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキン2などのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモン、胎盤ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロール、などのビタミン含有液、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ロイヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の健康食品や医薬品などを容易に製造できる。

【0044】以上述べたように、本発明でいう組成物

は、経口的又は非経口的に利用する飲食物、化粧品、医薬品のみならず、それ以外にも、例えば、生活用品、農林水産用品、試薬、化学工業用品など広範な用途を有する。

【0045】また、これら組成物に、本発明のマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質又はマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質を含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程で含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、浸漬、浸透、散布、塗布、噴霧、注入、固化などの公知の方法が適宜選ばれる。その含有せしめる量は、組成物によっても異なるが、一般的には、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトヘキサイトール又はマルトヘプタイトールとして、0.1%以上、望ましくは0.5%以上の量が好適である。次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0046】

【実験1 酵素の生産】可溶性澱粉2.0w/v%、ペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二カルシウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム・2水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%、炭酸カルシウム0.5w/v%、及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、15分間滅菌し、冷却して、アルカリゲネス ラタス D2271 (FERM BP-4578) を接種し、37℃、200rpmで20時間回転振盪培養したものを種培養とした。

【0047】容量30lのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度37℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度37℃で、約24時間通気攪拌培養した。培養液約19lを遠心分離して、培養液上清約18lを得た。培養液上清のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの活性は、58単位/mlであった。

【0048】

【実験2 酵素の精製】実験1で得た培養液上清をUF膜濃縮し、マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼをml当たり約1,200単位有する濃縮酵素液約800mlを回収した。得られた濃縮酵素液のうち300mlを5mM塩化カルシウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液上清(400ml)を、DEAE-トヨパールゲル650ゲル(東ソー株式会社製)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量100ml)を行った。

【0049】本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼはDEAE-トヨパールゲルに吸着せず、素通り画分にその活性が検出された。酵素活性画分を回収した後、0.5M硫酸を含む同緩衝液に対

して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、次に、ブチルトヨパール650ゲル(東ソー株式会社製)を用いた疎水カラムクロマトグラフィー(ゲル量100ml)を行った。吸着したマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを硫酸0.5Mから0Mのリニアグラジエントによりカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、フェニルスーパーローズHR5/5(スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)を用いた疎水カラムクロマトグラフィー(ゲル量10ml)を行い、溶出した酵素活性画分を回収した。

【0050】以上の精製手段により得られた精製酵素標品の酵素活性の回収率は、培養液上清のそれに対して約25%であった。また、精製酵素標品の比活性は蛋白質mg当たり1,860単位であった。なお、蛋白質はローリー法にしたがって牛血清アルブミンを標準にして定量した。精製した酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

【0051】

【実験3 酵素の性質】実験2の方法で得たマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼ標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度10w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラドラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量43,000±3,000ダルトンであった。精製マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを2w/v%アンフォライン(スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は7.6±0.5であった。

【0052】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を5mM塩化カルシウム存在下で、活性測定方法に準じて調べた。結果を図1(温度の影響)、図2(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は70℃付近、至適pHは約5.0であった。本酵素の熱安定性は、酵素溶液(5mM塩化カルシウムを含む20mM酢酸緩衝液、pH6.0)を各温度に1時間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を5mM塩化カルシウムを含む各pHの20mM緩衝液中で40℃、1時間保持した後、pHを6に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図3(熱安定性)、図4(pH安定性)に示した。本酵素の熱安定性は60℃付近までであり、pH安定性は約4.5乃至10.5であった。なお、カルシウムイオンを酵素液及び基質溶液から除いた条件では、ほとんど澱粉分解活性を示さず、カルシウム

イオンに対する依存度が顕著に高いアミラーゼであった。また、本酵素活性は、1 mM銅イオン、鉛イオン、亜鉛イオン、水銀イオン、又は10 mM EDTAで阻害された。

【0053】

【実験4 澱粉への作用】最終濃度2w/v%の可溶性澱粉(5 mM塩化カルシウムを含む20 mM酢酸緩衝液、pH5.5)に、温度40℃にて、実験2の方法で得た精製マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを澱粉グラム当たり50単位加えて反応させ、経時的に反応液を採取し、100℃で、10分間加熱して酵素を失活させた。この酵素反応液を用いて、加水分解率、青価、糖組成を分析した。

【0054】加水分解率は、反応液の全糖量をアントロン硫酸法で、還元糖量をソモギー・ネルソン法でグルコース換算で定量し、全糖量に対する還元糖量の割合として求めた。青価は、反応液0.1 mlを0.05 N硫酸水溶液15 mlに加え攪拌後、0.1 Nヨウ素溶液0.2 mlを加えて発色させ、660 nmにおける吸光度をヨウ素呈色度として測定し、0時間のヨウ素呈色度に対する各時間のヨウ素呈色度の百分率で求めた。

【0055】また、糖組成は反応液を脱塩処理した後、高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLCと略称す

反応時間 (分)	糖組成 (%)							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	≥ G8
5	0.0	0.0	0.2	0.2	0.3	2.1	2.2	95.0
10	0.0	0.7	0.9	0.7	1.0	3.9	4.0	88.8
20	0.0	1.5	2.0	1.8	1.8	7.8	7.8	77.2
30	0.0	2.7	3.3	2.7	2.6	11.7	11.0	66.0
60	0.0	6.0	6.0	4.3	3.8	19.4	16.1	44.4
90	0.4	8.5	7.1	4.8	4.2	25.4	18.8	30.8
120	0.7	10.1	8.4	4.5	4.0	25.7	19.3	27.3

【0058】表1の結果に示されるように、澱粉の加水分解率の増加に比較して、ヨウ素呈色度の減少が大きいこと、また、その反応初期から、微量ながらマルトース、マルトトリオースなどの低分子オリゴ糖が確認されることからエンド型アミラーゼであり、更に、反応生成物のアノマー型を旋光度法にて調べた結果、α型であったことから、本発明の澱粉分解酵素は、エンド型のα-アミラーゼであることが判明した。

【0059】また、表2の結果から明らかなように、反応初期からマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースを他のオリゴ糖よりも多く生成し、反応とともにこれらの成分は増加し、さらに反応時間を長くしてもマルトヘキサオース及びマルトヘプタオースの含量は減少しなかったことから、本発明の澱粉分解酵素は、澱粉から本質的にマルトヘキサオースとマルトヘプタオースを生成する新規なマルトヘキサオース、マルトヘプタオース生成

る。)にて分析した。HPLCの装置はCCPDシステム(東ソー株式会社製)、分析カラムはMCI GEL CK04SS(10 mmφ×200 mm、三菱化成株式会社製)、溶離液は水を流速0.2 ml/minで、検出は示差屈折計で行った。それらの結果を表1、及び表2に示す。

【0056】

【表1】

反応時間 (分)	加水分解率 (%)	ヨウ素呈色 (%)
0	1.9	100
5	3.6	45
10	5.3	19
20	8.0	4.5
30	9.8	2.0
60	13.4	1.0
90	14.7	0.9
120	15.7	0.9

【0057】

【表2】

タイプのα-アミラーゼであることが判明した。澱粉からのマルトヘキサオースとマルトヘプタオースの生成率は合計で約45%であった。

【0060】

【実験5 基質特異性】最終濃度2w/v%のアミロース、アミロペクチン、グリコーゲン、α-シクロデキストリン、β-シクロデキストリン、γ-シクロデキストリン、プルラン、デキストラン、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、あるいはマルトヘプタオースに、実験2の方法で得た精製マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを基質固着物グラム当たり50単位ずつ加え、5 mM塩化カルシウム存在下、40℃、pH5.5で2時間作用させた。酵素反応前後の反応液をキーゼルゲル60(メルク社製;アルミプレート、20×20 cm)を用いた薄層クロマトグ

ラフィー（以下、TLCと略称する。）にかけ、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。TLCは展開溶媒に1-ブタノール：ピリジン：水＝6：4：1（容積比）を用い、室温で1回展開した。発色は20v/v%硫酸-メタノール溶液を噴霧し、110℃で約10分間加熱して行った。

【0061】その結果、アミロース、アミロペクチン、グリコーゲンに作用して、可溶性澱粉を基質とした場合と同様に、主としてマルトヘキサオース、マルトヘプタオースを生成し、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、プルラン、デキストラン、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオースには作用せず、マルトヘプタオースからは、僅かにグルコースとマルトヘキサオースを分解物として生成していたが、きわめて作用しにくいものであることが判明した。

【0062】

【実験6 急性毒性試験】マウスを使用して、実施例A-7の方法で製造した粉末状マルトヘキサオース高含有糖質、粉末状マルトヘプタオース高含有糖質、実施例A-8の方法で製造したシラップ状マルトヘキサイトール高含有糖質及びシラップ状マルトヘプタイトール高含有糖質をそれぞれに経口投与して急性毒性テストを行った。その結果、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトヘキサイトール及びマルトヘプタイトールはいずれも低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。したがって、正確な値はいえないが、そのLD50値は、いずれも50g/kg以上であった。

【0063】以下、本発明の実施例を述べる。実施例Aでマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼとそれを用いたマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース含有糖質、又は、マルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール含有糖質の製造方法について述べ、実施例Bで該糖質を含有せしめた組成物について説明する。

【0064】

【実施例A-1】アルカリゲネス ラタス D2271（FERM BP-4578）を、培養温度を30℃とした以外は、実験1と同じ培地組成で、実験1の方法に準じてファーメンターで約30時間、通気攪拌培養した。この培養液上清のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの活性は、培養液ml当たり66単位であった。培養液をMF膜濾過し、その透過液をUF膜濃縮して、もとの培養液の活性に対して、約82%の収率で、マルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼをml当たり約1,300単位有する濃縮酵素液を得た。

【0065】

【実施例A-2】5%馬鈴薯澱粉乳（pH5.5）を加熱糊化させ、これを70℃に冷却して濃度0.02%になるように塩化カルシウムを加え、実施例A-1で調製したマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを澱粉グラム当たり2単位の割合になるように添加し、液化、糖化反応を20時間行った。その反応液をオートクレーブ（120℃）で20分間加熱し、酵素を失活させた後、冷却し、常法にしたがって活性炭で脱色・濾過し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約75%のシラップを原料固形物当たり収率約95%で得た。本品は、固形物当たりマルトヘキサオース24.2%、マルトヘプタオースを17.7%含有しており、また、その甘味度は砂糖のその約15%であった。本品は、低甘味剤として、またボディー付与剤、粘度調節剤、保湿剤、照付与剤、接着剤、保香剤、結晶防止剤、キャンディーのダレ防止剤などとして広く飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に有利に利用できる。

【0066】

【実施例A-3】10%馬鈴薯澱粉乳（pH4.5）を加熱糊化させた後、温度50℃に冷却し、これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当たり1000単位の割合になるよう加え、20時間反応させた。その反応液をpH5.2に調整し、オートクレーブ（120℃）を10分間行い、次いで、70℃に冷却して、これに濃度0.02%になるように塩化カルシウムを加え、実施例A-1で調製したマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを澱粉グラム当たり5単位の割合になるように添加し、液化、糖化反応を8時間行った。その反応液をオートクレーブ（120℃）で20分間加熱した後、冷却し、実施例A-2と同様に精製濃縮し、濃度75%のシラップを原料固形物当たり収率約93%で得た。本品の糖組成は、グルコース重合度5以下の少糖類40.3%、マルトヘキサオース27.3%、マルトヘプタオース19.2%、及びグルコース重合度8以上のデキストリン13.2%であった。本品は、低甘味、低糖度甘味剤などとして実施例A-2の場合と同様に広く飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に有利に利用できる。

【0067】

【実施例A-4】33%のとうもろこし澱粉乳に最終濃度0.1重量%となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH6.0に調整し、これに α -アミラーゼ（ノボ社製、商品名ターマミール60L）を澱粉グラム当たり0.2重量%になるよう加え、95℃で15分間反応させた。その反応液をオートクレーブ（120℃）を30分間行った後、50℃に冷却し、これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当たり500単位及び実施例A-1で調製したマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼを澱粉グラム

当たり1.8単位の割合になるように加え、40時間反応させた。本反応液を、実施例A-2と同様に加熱、冷却した後、精製濃縮し、噴霧乾燥して水分2%未満の粉末状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質を原料固形物当たり収率約90で得た。本品の糖組成は、グルコース重合度5以下の少糖類38.8%、マルトヘキサオース26.7%、マルトヘプタオース15.7%、及びグルコース重合度8以上のデキストリン18.8%であった。本品は、低甘味、低糖度甘味剤などとして実施例A-2の場合と同様に広く飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に有利に利用できる。

【0068】

【実施例A-5】実施例A-3の方法で得たマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質を強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーで分画し、マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含量を高めた。実施例A-3の方法で製造したマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質を、濃度5%にして原糖液とした。樹脂は、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂（三菱化成工業株式会社製、商品名ダイヤイオンSK 104 K⁺型、架橋度4%）を使用し、内径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラム4本を連結して、樹脂層全長を20mとした。カラム内温度を60℃に維持しつつ、原糖液を樹脂に対して7v/v%加え、これに60℃の温水をSV0.12の流速で流して分画し、マルトヘキサオース35%あるいはマルトヘプタオース25%以上のマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有画分を採取し、実施例A-2と同様に精製し、濃縮して、濃度75%のシラップ状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質を原糖液固形物当たり約50%の収率で得た。本品はマルトヘキサオースを固形物当たり約45%、マルトヘプタオースを同じく約31%含有しており、また、その甘味度は砂糖のその10%未満であった。本品は、低甘味、低糖度甘味剤などとして、実施例A-2の場合と同様に広く飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に有利に利用できる。

【0069】

【実施例A-6】実施例A-5の方法で得たシラップ状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有糖質を更に噴霧乾燥して、水分約2%未満の粉末状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有物を原料シラップ固形物当たり約98%の収率で得た。本品は、低甘味、低糖度甘味剤などとして、実施例A-2の場合と同様に広く飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に有利に利用できる。

【0070】

【実施例A-7】実施例A-5の方法で製造したマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有糖質を濃度

50%にして原糖液とした。樹脂は、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂（三菱化成工業株式会社製、商品名ダイヤイオンSK 104 K⁺型、架橋度4%）を使用し、実施例A-5と同様にカラムに充填した。カラム内温度を60℃に維持しつつ、原糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに60℃の温水をSV0.10の流速で流して分画し、マルトヘキサオース80%以上の高含有画分及びマルトヘプタオース70%以上の高含有画分をそれぞれ採取し、次いで、実施例A-2と同様に精製し、濃縮し、噴霧乾燥して、水分約2%未満の粉末状マルトヘキサオース高含有糖質及び粉末状マルトヘプタオース高含有糖質を原糖液固形物当たりそれぞれ収率約30%及び20%で得た。このようにして得られた粉末状マルトヘキサオース高含有糖質及び粉末状マルトヘプタオース高含有糖質の純度はそれぞれ約89%、約81%で、その甘味度は砂糖のその10%未満であった。本品は、低甘味、低糖度甘味剤などとして、実施例A-2の場合と同様に広く飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に有利に利用できる。

【0071】

【実施例A-8】実施例A-3の方法で製造したシラップ状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質を濃度50%にし、オートクレーブに入れ、触媒としてラネーニッケル10%を添加し、攪拌しながら温度を90乃至125℃に上げ、水素圧を20乃至100kg/cm²に上げて水素化を完了させた。次いでラネーニッケルを除去した後、実施例A-2と同様に精製し、濃縮して、水分25%のマルトヘキサイトール及びマルトヘプタイトール含有糖質を原料シラップ固形物当たり約90%の収率で得た。本品は、マルトヘキサイトールを固形物当たり約27%、マルトヘプタイトールを同じく約19%含有しており、また、その甘味度は砂糖のその約20%であった。本品は、低甘味、非還元性甘味剤として、また、ボディー付与剤、粘度調節剤、保湿剤、照付与剤、接着剤、保香剤、結晶防止剤、キャンディーのダレ防止剤などとして広く飲食物に利用される。

【0072】

【実施例A-9】実施例A-5の方法で製造したマルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有糖質を実施例A-8の方法で水素添加し、精製、濃縮し得られるマルトヘキサイトール及びマルトヘプタイトール高含有糖質を濃度50%にして原糖液とした。この糖液を実施例A-7の方法に準じて、強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、マルトヘキサイトール80%以上の高含有画分及びマルトヘプタイトール70%以上の高含有画分をそれぞれ採取し、次いで、実施例A-2と同様に精製し、濃縮し、濃度約75%のシラップ状マルトヘキサイトール高含有糖質及びシラップ状マルトヘプタイトール高含有糖質を原糖液固形物当たりそれぞれ収率約30%及び20%で得た。このように

して得られたシラップ状マルトヘキサイトール高含有糖質及びシラップ状マルトヘプタイトール高含有糖質の純度はそれぞれ約90%、約82%で、その甘味度は砂糖のその10%未満であった。本品は、低甘味、低糖度甘味剤などとして、実施例A-2の場合と同様に広く飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に有利に利用できる。

【0073】

【実施例B-1 甘味料】実施例A-2の方法で得たシラップ状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質1重量部に α -グリコシルステビオシド（東洋精糖株式会社製、商品名 α -Gスイート）0.02重量部を均一に混合して得たシラップ状甘味料は、甘味の質がすぐれ、砂糖の約2倍の甘味を有し、カロリーは甘味度当たり砂糖の約2分の1となる。したがって、本甘味料は、低カロリー甘味料として、カロリーの摂取を制限している人、例えば、肥満者、糖尿病患者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付けに好適である。また、本甘味料は、虫歯誘発菌によって酸の生成も少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことにより、虫歯を抑制する飲食物などの甘味付けにも好適である。

【0074】

【実施例B-2 カスタードクリーム】コーンスターチ500重量部、実施例A-6の方法で得た粉末状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有糖質400重量部、マルトース500重量部及び食塩5重量部を、篩を通して十分に混合し、鶏卵1,400重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳5,000重量部を徐々に加え、更にこれをとろ火にかけて、攪拌を続け、コーンスターチが完全に完全に糊化して全体が半透明になったとき火を止め、これを冷却して少量のバニラ香料を加えることによりカスタードクリームを製造した。本品は、なめらかで光沢を有し、甘味が強すぎず美味である。

【0075】

【実施例B-3 ういろう】米粉90重量部にコーンスターチ20重量部、砂糖20重量部、抹茶粉末1重量部、実施例A-8の方法で得たシラップ状マルトヘキサイトール及びマルトヘプタイトール含有糖質90重量部及び水の適量を加えて混練した後、これを容器に入れて60分間蒸して抹茶ういろうを製造した。本品は、照り、口当たりも良好で、風味もよかった。また、澱粉の老化も抑制され、長時間安定であった。

【0076】

【実施例B-4 ハードキャンディー】実施例A-3の方法で得たシラップ状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質70重量部に砂糖90重量部を混合溶解し、減圧下で水分約2%未満になるまで加熱濃縮して、これにクエン酸0.15重量部及び少量のレモン香料と着色料とを混和し、次いで、常法にしたがって成形

し、ハードキャンディーを製造した。本品は、吸湿性少なく、ダレを起こしにくい歯切れのよいハードキャンディーである。

【0078】

【実施例B-5 べったら漬】実施例A-2の方法で得たシラップ状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質1重量部、マルトース3重量部、甘草製剤0.05重量部、リンゴ酸0.008重量部、グルタミン酸ナトリウム0.07重量部、ソルビン酸カリウム0.03重量部及びプルラン0.2重量部を均一に混合してべったら漬の素を製造した。大根30kgを常法にしたがって食塩により下漬けし、次いで砂糖で中漬けしたものを、本べったら漬の素4kgで調製した調味液に漬けて、べったら漬を製造した。本品は、色艶、香気共に良好で、適度の甘味を有し歯切れもよかった。

【0079】

【実施例B-6 経管栄養剤】実施例A-4の方法で得た粉末状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース含有糖質20重量部、グリシン1.1重量部、グルタミン酸ナトリウム1重量部、乳酸カルシウム0.4重量部、炭酸マグネシウム0.1重量部、チアミン0.01重量部及びリボフラビン0.01重量部からなる配合物を調製する。この配合物24gずつをラミネートアルミ製小包に充填し、ヒートシールして製品を得た。本品は、1袋分を約33乃至500mlの水に溶解して栄養補給液とし、経管方法により、鼻腔、胃腸などへ投与して使用する。本品は、ヒトのみならず、家畜などへの非経口的栄養補給液としても有利に利用できる。

【0080】

【実施例B-7 経管栄養剤】実施例A-6の方法で得た粉末状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有糖質80重量部、乾燥卵黄190重量部、脱脂粉乳209重量部、塩化ナトリウム4.4重量部塩化カリウム1.85重量部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0.01重量部、アスコルビン酸ナトリウム0.1重量部、ビタミンEアセテート0.6重量部及びニコチン酸アミド0.04重量部からなる配合物を調製する。この配合物25gずつをラミネートアルミ製小包に充填し、ヒートシールして製品を得た。本品は、1袋分を約150乃至300mlの水に溶解して栄養補給液とし、経管方法により、鼻腔、食道、胃などへ投与して使用する。

【0081】

【実施例B-8 錠剤】アスピリン50重量部に、マルトース10重量部、コーンスターチ4重量部及び実施例A-6の方法で得た粉末マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有糖質4重量部を均一に混合した後、直径12mm、20R杵を用いて1錠680mg、錠剤の厚さ5.25mm、硬度8kg \pm 1kgで打錠した。本品は、適度の甘味を有する飲み易い錠剤である。

【0082】

【実施例B-9 乳液】ポリオキシエチレンベヘニルエーテル0.5重量部、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール1重量部、親油型モノステアリン酸グリセリン1重量部、ベヘニルアルコール0.5重量部、アボガド油1重量部、実施例A-9の方法で得たシラップ状マルトヘキサイトール高含有糖質3.5重量部、 α -グリコシルルチン1重量部、ビタミンE及び防腐剤の適量を、常法にしたがって加熱溶解し、これに1, 3-ブチレングリコール5重量部、カルボキシビニルポリマ-0.1重量部及び精製水85.3重量部を加え、ホモゲナイザーにかけて乳化し、乳液を製造した。本品は、保湿性ある乳液で、日焼け止め、色白剤などとして有利に利用できる。

【0083】

【実施例B-10 スキンクリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、 α -グリコシルルチン2重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部、実施例A-7の方法で得た粉末状マルトヘキサオース高含有糖質4重量部及び防腐剤の適量を、常法にしたがって加熱溶解し、これに1, 3-ブチレングリコール5重量部、及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけて乳化し、更に、香料の適量を加えて攪拌混合し、クリームを製造した。本品は、伸びの良いクリームで、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0084】

【実施例B-11 練歯磨】第二リン酸カルシウム45重量部、ラウリル硫酸ナトリウム1.5重量部、グリセリン25重量部、ポリオキシエチレンソルビタンラウレート0.5重量部、実施例A-5の方法で得たシラップ状マルトヘキサオース及びマルトヘプタオース高含有糖質15重量部、サッカリン0.02重量部及び防腐剤0.05重量部を水13重量部と混合して練歯磨を得た。本品は、光沢、洗浄力も良好で、練歯磨として好適である。

【0085】

【実施例B-12 肥料杭】配合肥料(N=14%、P₂O₅=8%、K₂O=12%)、プルラン、実施例A-3の方法で得たマルトヘキサオース及びマルトヘプタオ

ース含有糖質、硫酸カルシウム及び水の割合を重量でそれぞれ70、5、5、15及び5として充分混合した後、押出機(L/D=20、圧縮比=1.8、ダイスの口径=30mm)で80℃に加熱して肥料杭を製造した。本品は、肥料用容器が不要で取扱い容易であり、全層施肥に適した強度を有し、更に配合割合を変えることにより肥料成分の溶出速度を調節できる。必要ならば、この肥料杭に植物ホルモン、農業用薬剤及び土壤改良剤等の混合も容易である。

【0086】

【発明の効果】上記から明らかなように、本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼは、至適温度、安定温度における温度が高く、また、至適pH、安定pHにおけるpH域が広く、更に産生微生物からの酵素生産量も高く、澱粉質からのマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース高含有糖質及びマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール高含有糖質の製造に有利に利用しうることが半明し、その工業的意義はきわめて大きい。

【0087】更に、このようにして製造されるマルトヘキサオース及び／又はマルトヘプタオース高含有糖質及び、それを水素添加して得られるマルトヘキサイトール及び／又はマルトヘプタイトール高含有糖質は、低甘味性の甘味剤として、またボディー付与剤、粘度調節剤、保湿剤、照付与剤などとして、さらには、栄養補給用剤などとして広く飲食物、化粧品、医薬品、成形物など各種組成物に供しうることも大きな特徴である。

【図面の簡単な説明】

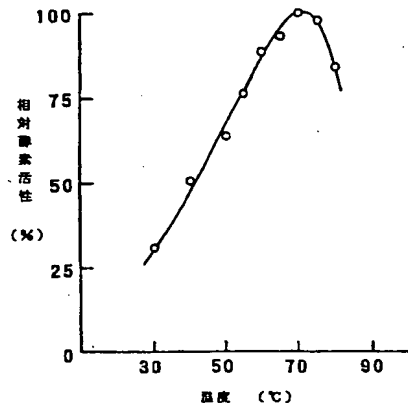
【図1】本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図2】本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

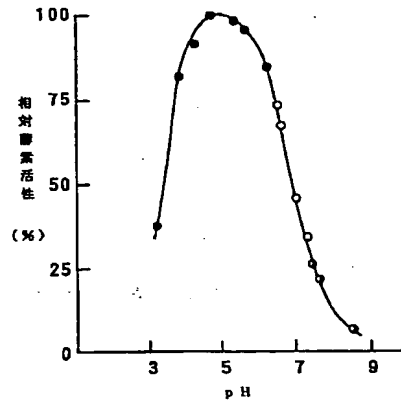
【図3】本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図4】本発明のマルトヘキサオース・マルトヘプタオース生成アミラーゼの安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図1】

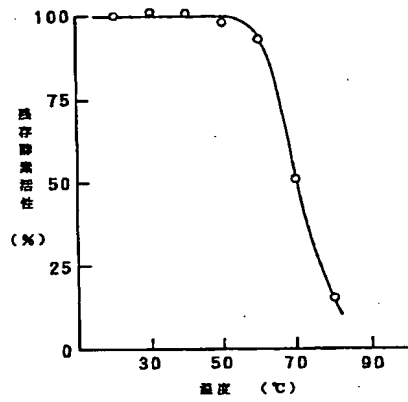


【図2】

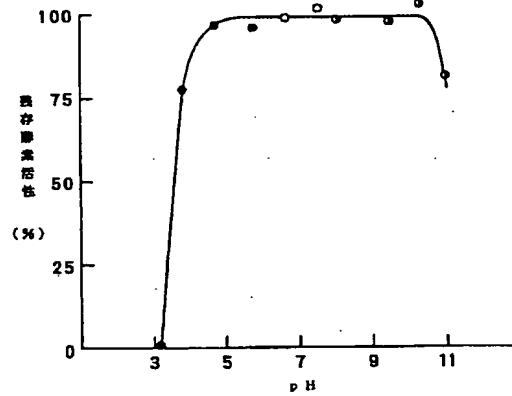


○ 酢酸緩衝液
○ リン酸緩衝液
● トリス-塩酸緩衝液

【図3】



【図4】



● 酢酸緩衝液
○ リン酸緩衝液
○ 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液